

SESIONES CIENTIFICAS

ELECTROFORESIS

Dr. F.-E. RAURICH SAS

EN cumplimiento de lo dispuesto por el Reglamento de esta Real Academia de Medicina, según el cual el Discurso Inaugural debe ser leído por riguroso orden escalafonal de sus Miembros Numerarios, me corresponde leer el de este curso de 1961.

A pesar de que muy poco más de una octava parte del número de sillones de esta Docta Corporación deben estar y están ocupados por Farmacéuticos, por así disponerlo los Estatutos de las Academias de Medicina del Reino, resulta que hace justo 40 años que ningún Académico Farmacéutico ha tenido a su cargo la Oración Inaugural como consecuencia de las vacantes de Numerarios salvajemente producidas por nuestra guerra sumadas a las que normalmente, por desgracia, en ella tienen lugar.

Si de estos 40 años se descuentan los 10 en que no se celebró Sesión Inaugural (1937 a 1946 am-

bos inclusive) quedan aún 30 años, o sea que en nuestra Real Academia de Medicina, ha transcurrido una generación sin que en este Solemne Acto se oyese la voz de un Farmacéutico.

Fué en la Inaugural de 1921 en que el doctor don Rafael Calvet Patxot cerró un ciclo de 27 años durante el cual fueron 6 los Farmacéuticos a cuyo cargo, como Numerarios, corrió la parte Académica de la Sesión Inaugural (Profesor (1) doctor D. Francisco de A. Arola Doménech en 1894; Dr. don Ramón Codina Länglin en 1900 (2); D. Francisco Puigpiqué Raurich en 1912; doctor don Pedro Genové Soler en 1918; doctor don Benito Oliver Rodés en 1920 y el ya nombrado doctor don Rafael Calvet Patxot en 1921).

En estos últimos 67 años los 6 Académicos Farmacéuticos nombrados se ocuparon en su Discurso Inaugural de temas netamente científicos (Profesor Arola; «Puede justificarse científicamente la

(1) Auxiliar Numerario de Materia Farmacéutica Animal y Vegetal de mi Facultad y Académico de Número que también fue de nuestra Real de Ciencias y Artes.

(2) También Académico de nuestra Real de Ciencias y Artes.

importancia terapéutica de las kolas africanas». Doctor Codina Länglin; «Necesidad de fijar un coeficiente posológico de los Medicamentos galénicos». Señor Puigpiqué Raurich; «Fases de la Química». Doctor Genové Soler; «El Isonismo. Su aplicación en Terapéutica». Doctor Oliver Rodés; «A propósito de la representación gráfica de los Análisis de Orina». Doctor Calvet Patxot; «Los gases asfixiantes durante la Gran Guerra»), lo que para continuar con la tradición, si así puede llamarse, de los Farmacéuticos de esta Docta casa, o con la regularidad de su actuación, me obliga a ocuparme de un tema científico, a pesar de mi criterio sobre la conveniencia de no hablar en Actos como este de asuntos netamente científicos, como he manifestado en las dos ocasiones que, con una diferencia de 14 años, me ha correspondido leer la Oración Inaugural de curso de la Real Academia de Ciencias y Artes.

El tema escogido es de actualidad y de gran importancia como método Físico Analítico para todo cuanto tiene relación con las ciencias que cultivamos quienes pertenecemos a cualquiera de las tres ramas de la Sanidad: Farmacéuticos, Médicos y Veterinarios, nombrados por orden alfabético de las iniciales de las respectivas Facultades Universitarias.

Sobre él se hablará, de modo suscito como corresponde a este Acto, de los puntos principales

que deben tenerse muy presentes si se quieren obtener resultados correctos dentro de los errores naturales propios de las formas de operar usadas, al practicar una

ELECTROFORESIS

La primera idea de los coloides se debe a A. Baudrimont en 1844, que fueron denominados «pseudo disoluciones» por F. Selmi en 1847. T. Graham, que ya los llamó coloides, ha sido, no obstante, el verdadero descubridor de sus propiedades en sus trabajos de 1861, 1862, 1863 y 1864.

Puede asegurarse que Graham debía haber practicado alguna electroforesis, no sólo porque en aquellos años se aplicaba la corriente eléctrica producida por pilas a todos cuantos fenómenos o experiencias eran observadas o practicadas para ver y anotar su acción, sino también porque H. Quincke en el mismo año 1861 las había verificado.

Son muchos los autores que han hecho resaltar cierta analogía de la electroforesis con las electrolisis.

Pero para conseguir la sistematización de la electrolisis hasta lograr la casi total perfección con que se practica desde hace unos 40 años con gran profusión en la industria y como método analítico de Laboratorio de los más estimables por su exactitud, ha necesitado, desde 1809 en que fue dada a conocer por Davy, del concurso de los

trabajos de J. J. Berzelius sobre la teoría electroquímica en 1811, de las publicaciones de A. M. Ampère en 1814, de las leyes que la rigen enunciadas por M. Faraday en 1833, el cual, al año siguiente empleó ya la palabra *ión* en el sentido de *viajero*, junto con los trabajos de G. Hittorf en 1853 sobre transporte iónico, más los de R.J.E. Clausius en 1857 sobre el concepto base de que la disociación se produce por la simple disolución de los cuerpos disociables, completados con los estudios de G. Kirchhoff en 1860, de C. M. Guldberg y B. Waage en 1867, de Van der Waals en 1881, de A. Classen en el período 1881 a 1927, de F. Kohlrausch en 1885, de S. A. Arrenius con su teoría clásica publicada en 1887 que con pequeñas variantes (P. J. W. Debye y E. Hückler en 1923, J. N. Brønsted y T. M. Lowry en 1923 y J. N. Lewis en 1938) es aún en la actualidad aceptada, más los trabajos de J. H. van't Hoff sobre la relación de la constante dieléctrica de los disolventes y de los disueltos con sus propiedades disociantes y disociables publicadas en 1886, los de W. F. Ostwald en el período 1888 a 1894 junto con los de L. Claisen en 1897, para no citar más que los que creo principales del siglo XIX, a los que hay que añadir en inacabable lista los investigadores de los primeros quince años del siglo actual.

La electroforesis que se ha aprovechado como es natural de los conocimientos y experiencia adquiri-

dos en la electrólisis por la analogía antes indicada, ha necesitado además del progreso con que ha ido desarrollándose el conocimiento del estado coloidal llevado a cabo por número también enorme de investigadores del siglo pasado y del actual, por cuyo motivo sólo se citarán, al igual que se ha hecho para la electrolisis, unos cuantos nombres escogidos por la importancia que creo tienen sus trabajos para nuestro tema. W. Pfeffer en 1877, C. von Nägeli en el período 1877 a 1879, W. Ostwald de 1885 a 1896, F. Hofmeister en 1889, O. Lehmann en 1890, E. Grimaux en 1894, O. Bütschli en 1896, y en el mismo año C. J. Martín, A. Coen, A. Lottermoser. E. von Meyer y H. Rodewald cada uno de ellos independientemente en 1897, R. E. Liesegang en el período 1898 a 1918, W. B. Hardy en 1899 que empleó ya la palabra «cataforesis», Th. Svedberg en el período 1900 a 1928, J. Duclaux de 1901 a 1930, H. Siedentoff de 1903 a 1910, E. W. Reid en 1903, L. Michaelis en el período 1905 a 1912 que a partir de 1909 emplea ya la palabra «electroforesis», R. Zsigmondy en el período 1905 a 1920, J. H. Matthews en 1906. C. W. Wo. Ostwald desde 1909 a 1925 que dio a conocer su clasificación de los sistemas dispersos, F. J. Donnan en 1911, S. Oden en 1912, P. Bang en el período 1912 a 1930, A. de Gregorio Rocasolano de 1917 a 1920, J. de Ward en 1918, S. P. L. Sörensen en 1918, J. B. Bastero Beguiristain en 1919, H.

Staudinger a partir de 1926, A. Butaric en el período 1927-1934, J. Perreau en 1927, P. Lecompte de Naüy en 1929 y R. Bradfield en el mismo año al igual que J. Giral Pereira y también A. von Bunach, J. V. Rubió en 1929 y en 1931 y H. Kröpelin en 1930 y por lo que hace referencia de modo ya concreto a la electroforesis en los primeros pasos para su utilización como método físico de análisis, conviene citar otros pocos autores, alguno de los cuales llegaron ya incluso a determinar velocidades electroforéticas.

En primer lugar deben citarse a H. Picton y S. E. Linder que en el período 1892 a 1897 demostraron de manera irrefutable que las partículas que formaban unas pseudo disoluciones se movían dentro de un campo eléctrico hacia el ánodo, y en cambio las de otros coloides, el movimiento lo verificaban hacia el cátodo, J. Quinke en 1899, J. Bredig en 1901, A. Cotton en 1904 y H. Mouton también en 1904, E. F. Durlon en el período 1906 a 1909, A. Mayer en 1908, W. de Kopaczewsky desde 1911 a 1913, A. von Galecki en 1915 y J. Zueb desde 1922 a 1925, señorita M. E. Lang en 1924 y el ya citado Th. Svedberg en 1928.

La electroforesis se ha aprovechado también del gran desarrollo que ha adquirido en estos últimos 30 años otro procedimiento físico de análisis químico de importancia análoga, la cromatografía, de la que ha captado casi todas sus

fases la forma más usada de practicar la electroforesis, hasta el extremo de que podría denominarse, como ya se ha propuesto, aunque con algunos reparos, electrocromatografía (H. Strein y T. R. Sato en 1954).

Las razones teóricas del origen de la carga eléctrica con que gránulos de materia coloide se transforman en micelas o ultramicrones, cuya existencia parece deduirse de las experiencias electroforéticas practicadas por los autores mencionados, que explican además los fenómenos que en ellas tienen lugar, permiten deducir, como se dirá, las condiciones adecuadas para practicar una electroforesis teóricamente perfecta por simple comparación con una electrólisis, teniendo en cuenta, claro está, las diferencias en la naturaleza de los problemas por una parte y también los diferentes factores que interfieren la ejecución de una y otra operación: al fin y al cabo, aunque en concepto simplista, una electroforesis no es más que una electrólisis de un dispersoide con micelas o ultramicrones en lugar de serlo de un dispérido con amicrones de tipo iónico.

Peró entre electroforesis y electrólisis hay una diferencia fundamental: En la electrólisis, interesa la más o menos rápida descarga total de los diferentes iones en cualquier clase de sus posibles disoluciones para su completa separación sin tener demasiado en cuenta, por lo general, las diferentes

movilidades iónicas y en la electroforesis, en cambio, sólo interesa la separación de las micelas de los diferentes dispersoides posibles sin que pierdan su carga, ya que los respectivos gránulos no interesan, basándose en la distinta movilidad electroforética de cada clase de micelas existentes en las posibles pseudo disoluciones sin que tenga, casi, importancia el tiempo necesario para conseguirlo.

La electroforesis puede practicarse de varias maneras. La forma llamada libre propuesta por A. Tiselius en 1937 se efectúa con la disolución problema de análoga manera como la efectuaron los autores anteriormente mencionados, pero con material más perfeccionado, consistente en síntesis en un tubo en U formado por tres piezas en el que se coloca el problema y una disolución reguladora de pH, observándose el movimiento electroforético micelar por métodos ópticos que el propio Tiselius ha ido perfeccionando hasta adoptar en 1950 y 1951 el método óptico empleado por Svedberg en su ultracentrífuga. J. St. Philipott en 1938 y H. Svenson en 1939 y 1940 trabajaron intensamente con este método que necesita material costoso, es delicado en su manejo y las determinaciones se hacen sumamente largas.

Otra manera de ejecutar la electroforesis, consiste en tomar cuerpos sólidos de muy diferentes clases como soporte de los problemas, idea dada a conocer ya en

1907 por G. Field y S. Teague que emplearon como soporte un gel de agar-agar llamando al procedimiento agarforesis. Como soportes han sido empleados además de agar-agar, la lana de vidrio, gelatina, algodón, gasa, seda, gel de ácido silícico, almidón, perlas de vidrio, amianto y varios otros cuerpos.

El empleo de geles diversos que en la actualidad va adquiriendo cada vez más importancia por la rapidez con que se efectúan las determinaciones no es cosa nueva, pues, aparte de la agarforesis antes mencionada, J. Kendall, E. Jette y W. Wert, utilizaron ya diferentes geles en 1926.

Pero el soporte más utilizado en estos últimos años ha sido el papel propuesto por primera vez por P. König en 1937 y por P. König y D. von Klobusitsky en 1939, siendo el procedimiento que más ha contribuido al desarrollo y sistematización del análisis electroforético, sobre todo a partir de 1953 en que el propio Tiselius junto con P. Flodin reconocieron las ventajas de la electroforesis en papel sobre la electroforesis libre. Variantes de la electroforesis sobre papel o electromigración sobre papel como propuso llamarla M. Mc. Donald en 1952 o ionoforesis sobre papel como la nombraban A. J. P. Martín y R. L. M. Synge en 1945, se han propuesto varias y se emplean algunas como son, para solo citar las más importantes, electroforesis continua sobre

papel debida a H. Svensson e I. Bråtten en 1949; electroforesis sobre papel en dos dimensiones practicada por J. Sternberg en 1953 y electroforesis aconsejada por M. Macheboeuf en 1953 que no es más que una electroforesis con evaporación controlada del disolvente de la disolución soporte empleada.

El número de trabajos publicados sobre este tema en estos últimos años es asombrosamente fantástico y los resultados prácticos desde el punto de vista analítico con ellos obtenidos, son asimismo en cantidad verdaderamente insospechada.

Para dar una leve idea de lo que con el párrafo que antecede, se quiere significar, bastará decir que cualquier obra sobre electroforesis sobre papel, tiene una cantidad de citas tal que parece desproporcionada al número de sus páginas; sirvan como ejemplo las siguientes.

En las 137 páginas dedicadas a la electroforesis sobre papel de la obra de R. J. Block, E. L. Durrum y Q. Zweig de 1955 se citan 104 trabajos; en las 191 páginas de texto de la obra de Michael Lederer de 1955 también sobre nuestro tema son 263 las citas que se contienen; en las 120 pág. que ocupa la traducción francesa de 1956 de la obra de Ch. Wunderley se citan la fantástica cifra de 548 trabajos y finalmente, para no molestar más la atención de ustedes en el resumen de 220 pág. del Sym-

posium sobre electroforesis sobre papel organizado en 1955 por la Fundación Ciba de Londres, entre los 18 especialistas de renombre universal en la materia que actuaron como ponentes, entre otros W. Grassmann, M. y E. Lederer, A. J. P. y N. H. Martín, E. L. Durrum, C. F. O. R. Morris, J. C. White y H. J. Mc. Donald para sólo citar los más destacados, y los 29 especialistas también universalmente conocidos que intervinieron en las discusiones, se citan la enorme cifra de 292 trabajos.

Y en estos últimos 4 años el número de publicaciones sobre el tema creo poder decir que ha aumentado en progresión más que geométrica, por cuyo motivo me veo obligado a no citar ningún autor para no alargar más esta ya demasiado extensa lista de citas.

Para desarrollar la idea expuesta que guió la elección del tema, sólo voy a ocuparme de la electroforesis sobre papel, ya que esta es la forma más usada entre nosotros de este tipo de determinaciones analíticas. Como es natural, no voy a hablar de los aparatos muy diversos que se emplean para la obtención de los electroforogramas sobre papel, por lo que nos haremos a la idea de imaginar una tira de papel de filtro de unos 30 cm. de largo y de anchura variable, constantemente humedecida por una disolución reguladora de pH conocido, en la que se colocó, previamente, en una señal marcada

transversalmente en la mitad de la longitud de dicha banda de papel una simple gotita de una disolución coloidal compleja por contener dispersadas micelas de diferentes especies químicas y sometido el conjunto a la acción de un campo eléctrico constante con sólo establecer, mediante los correspondientes electrodos, una diferencia de tensión estabilizada y conocida E , entre los extremos de la tira.

La intensidad del campo eléctrico, si d_r es la distancia real entre los electrodos, valdrá $\frac{E}{d_r}$, valor que, multiplicado por la carga micelar C , nos dará la fuerza $F = \frac{E}{d_r} \times C$, que actúa sobre las micelas para su migración, adquiriendo una *velocidad electroforética verdadera* w^v , de la que se deduce su *movilidad electroforética verdadera* U_{ef}^v , expresada en cm./seg./volt. mediante la sencilla fórmula:

$$U_{ef}^v = \frac{u_{ef}^v \times d_r}{E}$$

Las movilidades electroforéticas verdaderas de las diferentes clases de micelas existentes son del orden de las décimas, unidades y en algunos casos dos o tres decenas de *cientmilésimas de cm.* (10^{-5} cm.), unidad que es la misma de los valores con que se expresan las movilidades iónicas (decenas o a lo más unas pocas centenas de *cientmilésimas de cm.*), dato

que demuestra la semejanza entre la electroforesis y la electrolisis.

Pero la disolución reguladora de pH conocido que constantemente está humedeciendo la tira de papel en cuyo seno líquido tiene lugar la migración micelar, opone una fuerza F' a su desplazamiento, fuerza que vale

$$F' = 6 \times \pi \times r \times \eta \times u_{ef}^v$$

Si r y η representan, respectivamente, el radio micelar y la viscosidad del líquido, con lo que, para que la migración se verifique, es preciso que $F = F'$ y, por lo tanto, la movilidad electroforética verdadera será también igual a

$$U_{ef}^v = \frac{C}{6 \times r \times \pi \times \eta}$$

Por otra parte, en la superficie de separación de las micelas con el líquido en el que están dispersadas se origina un potencial electrocinético o potencial zeta ξ , de valor muy pequeño, que depende de la constante dieléctrica ϵ del líquido y de la carga C y radio r de las micelas que vale $\xi = \frac{C}{r \times \epsilon}$,

por lo que, sustituyendo C en el valor de U_{ef}^v anterior por el que se deduce de ξ , $C = \xi \times r \times \epsilon$, resultará que la movilidad electroforética verdadera es asimismo igual a:

$$U_{ef}^v = \frac{\epsilon}{6 \times \pi \times \eta} \times \xi$$

fórmula en la que no interviene ni la carga C ni el tamaño de las partículas, puesto que en ella no figura r , al que le es proporcional. Esta es otra razón que explica el

por qué las movilidades electroforéticas son del mismo orden de las iónicas, a pesar de la gran diferencia de tamaños.

El segundo miembro de la igualdad que antecede debe multiplicarse por un factor, A , para tener en cuenta la influencia que en el potencial zeta, ξ , ejerce la fuerza o concentración iónica total μ_t , de la disolución reguladora de pH conocido que constantemente humedece la tira de papel electroforético, factor que vale

$$A = \frac{1}{1 + K \times r \times \sqrt{\mu_t}}$$

siendo K una constante igual a $0,235 \times 10^{-8}$, con lo cual la movilidad electroforética verdadera U_{ef}^v puede expresarse mediante las tres igualdades siguientes:

$$U_{ef}^v = \frac{u_{ef} \times d_r}{E};$$

$$U_{ef}^v = \frac{\epsilon}{6 \times \pi \times \eta} \times \frac{1}{1 + K \times r \times \sqrt{\mu_t}};$$

$$U_{ef}^v = \frac{C}{6 \times \pi \times r \times \eta} \times \frac{1}{1 + K \times r \times \sqrt{\mu_t}}$$

(μ_t es la suma de las *concentraciones* o *fuerzas iónicas* parciales correspondientes a cada uno de los electrólitos que integran la disolución reguladora de pH utilizada, para cada uno de los cuales el valor de su fuerza iónica respectiva vale,

$$\mu = \frac{c(n_a \times v_a^2 + n_c \times v_c^2)}{2},$$

en la que c =concentración molecular del electrólito; n_a =número de

aniones que forma; v_a =número de cargas que lleva cada uno; n_c =número de cationes a que da origen, y v_c =número de cargas que tiene cada uno).

Con la primera de las fórmulas que anteceden es muy fácil calcular la movilidad electroforética verdadera U^v siempre que se conozca el valor de la tensión aplicada E y se determinen la distancia real entre los electrodos d_r y la velocidad electroforética verdadera u_{ef}^v .

Pero la distancia real entre los electrodos, d_r , no es la que mediante un doble decímetro se mide, d_m , sino que es mayor debido a las irregulares sinuosidades de los canalículos del papel electroforético, que actúa como soporte, por los que pasa la corriente eléctrica conducida por la mezcla reguladora de pH, que los llena por completo, lo que obliga a multiplicar la distancia medida, d_m , por un factor de transformación, f_t , variable según la clase, el tipo y la marca de papel, pues la irregularidad de las sinuosidades de los canalículos cambia según la manera y a veces los detalles de su fabricación; su valor oscila entre 1,25 y 2,00. En consecuencia:

$$d_r = d_m \times f_t$$

Este es uno de los motivos por los que es indispensable consignar siempre la marca y clase de papel empleado en cualquier electroforesis junto con su factor de

transformación, f_t , ya que no todas las marcas son igualmente utilizadas, cuando no conocidas, en todas las naciones.

La manera de calcular la velocidad electroforética verdadera w_{ef}^v es un poco más larga.

Como es natural, se deduce de un espacio y un tiempo; pero el espacio recorrido por las micelas al cabo del tiempo, t , que ha durado la electroforesis que mediante un doble decímetro se mide, e_m , no es el espacio real, e_r , que ellas han recorrido, el cual a su vez no es tampoco el espacio verdadero, e_v , que hubiesen recorrido de no existir interferencias, y el valor de e_v es el único que ha de utilizarse para calcular la velocidad electroforética verdadera w_{ef}^v .

El espacio recorrido real, e_r , se obtiene sin más que multiplicar el espacio recorrido medido, e_m , por el factor de transformación, f_t , usado para hallar la distancia real entre los electrodos, d_r , por la misma razón allí expuesta, reforzando la necesidad de esta multiplicación el motivo que hace indispensable indicar siempre, junto con la clase, tipo y marca del papel, el valor de su f_t .

Es evidente que con el valor del espacio recorrido real, e_r , hallado puede calcularse la velocidad electroforética real w_{ef}^r y de ella deducir la movilidad electroforética real U_{ef}^r aplicando las adjuntas

fórmulas que aparecen en algunas obras:

$$U_{ef}^r = \frac{e_r \times d_r}{t \times E} = \frac{e_m \times d_m}{t \times E} \times f_t^2 = \\ = \frac{e_{ef}^m \times d_m}{E} \times f_t^2 = U_{ef}^m \times f_t^2$$

que se deducen de cuanto antecede expresado mediante las siguientes igualdades:

$$\frac{e_m}{t} = u_{ef}^m; \quad \frac{e_m}{t} \times f_t = u_{ef}^r; \\ \frac{e_m \times d_m}{t \times E} = U_{ef}^m; \quad \frac{e_{ef}^m \times d_m}{E} = U_{ef}^r$$

Para convertir la velocidad electroforética real w_{ef}^r en la verdadera w_{ef}^v es preciso transformar el espacio recorrido real, e_r , en el espacio recorrido verdadero, e_v , teniendo en cuenta las interferencias que, como se ha indicado, son las causantes de la diferencia entre sus valores: la electrosmosis que entre papel y líquido regulador de pH tiene lugar y la evaporación del disolvente, agua, son los dos más importantes.

En la superficie de contacto entre el papel electroforético que actúa de soporte y la disolución reguladora de pH se origina un potencial electrocinético o potencial zeta, ξ , cargándose negativamente las tiras de papel como cuerpo sólido que son y positivamente la mezcla reguladora que actúa de líquido de fondo; como las tiras quedan fijas en el aparato utilizado, el líquido adquiere, por efectos de la tensión E aplicada, un movimiento recorriendo un espacio

e_{eo} hacia el cátodo, al que corresponde una velocidad electromotórica u_{eo} .

Si en la electroforesis practica-da las micelas han dado origen a una cataforesis, por ser de carácter basoide, es evidente que al espacio recorrido medido, e_m , debe restársele el espacio recorrido electromotórico, e_{eo} , para tener el *correcto valor del espacio recorrido medido*, e_m^c , a emplear para el cálculo del espacio recorrido real, e_r , que se convierte entonces en el espacio recorrido verdadero, e_v . Las expresiones siguientes darán mejor idea de lo que antecede:

$$\text{Basoides: } e_m - e_{eo} = e_m^c$$

$$\text{y } e_m^c \times f_t = e_r \rightarrow e_v$$

Si en la electroforesis practica-da las micelas dan origen a una anaforesis, por ser de carácter acidoide, es también evidente que entonces el espacio recorrido electros-motórico, e_{eo} , debe sumarse al espacio recorrido medido, e_m , para tener el *correcto valor del espacio recorrido medido*, e_m^c , que, multiplicado por el factor de transformación, f_t , dará el espacio recorrido real, e_r , convertido entonces en el espacio recorrido verdadero, e_v , o sea:

$$\text{Acidoides: } e_m + e_{eo} = e_m^c$$

$$\text{y } e_m^c \times f_t = e_r \rightarrow e_v$$

La otra interferencia a tener en cuenta es debida a que por presentar las tiras de papel electroforético una gran superficie, la evaporación del disolvente, agua,

que en ella tiene lugar, o sea, la velocidad de evaporación, u_{ev} , ocasiona variaciones locales, tanto más intensas cuanto mayor sea ella, en la concentración de electrolitos existentes en la disolución reguladora de pH, con el consiguiente cambio de valor de éste, variando, además, su fuerza iónica total μ_t , su viscosidad η , su resistencia R y su conductibilidad Λ , que, como se dirá más adelante, afectan todos al valor del espacio recorrido medido, e_m , y, por lo tanto, a la velocidad y movilidad electroforéticas.

Para la disminución de sus efectos, las tiras de papel durante toda la electroforesis quedan, en la mayoría de aparatos, encerradas casi herméticamente en atmósfera húmeda, con dispositivos muy sencillos que permiten tener los electrodos externos para el fácil desprendimiento de los gases que alrededor de ellos se forman.

Las variantes propuestas en la manera de quedar tendidas las tiras de papel durante la operación tienen como fin principal reducir al mínimo posible esta causa de error.

La electroreoforesis propuesta por Macheboeuf, al principio citada, tiene por principal objeto reducir esta interferencia hasta valores que permitan, por su pequeñez, no tener que hacer esta corrección por evitar que prácticamente se produzca velocidad de evaporación ninguna.

Esta corrección debe efectuarse

una vez convertidos los espacios recorridos en velocidades. Además; la velocidad de evaporación, u_{ev} , actúa en el mismo sentido que la velocidad electrosmótica, u_{eo} por lo que se corrigen simultáneamente por determinarse al mismo tiempo, o mejor conjuntamente, sus dos valores.

La corrección se efectúa mediante la igualdad

$$u_{ef}^m \mp (u_{eo} + u_{ev}) = \\ = \text{correcto valor de } u_{ef}^m$$

utilizando el signo $-$ en las anaforesis y el signo $+$ en las cataforesis, y, para hallar el valor de la velocidad electroforética verdadera u_{ef}^v se utiliza esta otra, que es resumen de todas las correcciones que deben efectuarse según se ha indicado en cuanto antecede:

$$[u_{ef}^m \mp (u_{eo} + u_{ev})] \times f_t = \\ = \text{correcto valor de } u_{ef}^r, \\ \text{con lo que se convierte en } u_{ef}^v$$

La suma ($u_{eo} + u_{ev}$) se determina en cada operación electroforética colocando en la misma línea de partida, señalada en la tira de papel, en la que se coloca el problema, una gota de disolución de glucosa, mejor tetrametilglucosa (2, 3, 4, 6) o dextrina y, una vez terminada la electroforesis, midiendo la distancia entre la línea de partida y otra a ella paralela hacia el cátodo, llamada línea de flujo nulo, hasta donde ha llegado

la glucosa o sus sustituyentes. Este espacio recorrido e_s es la suma de los originados por las velocidades u_{eo} y u_{ev} , el cual, dividido por el tiempo que dure la electroforesis, dará el valor de $u_{eo} + u_{ev}$

$$\frac{e_s}{t} = (u_{eo} + u_{ev})$$

Para el objeto de nuestro tema interesa más que la igualdad que se utiliza, como se ha visto, para calcular la movilidad electroforética verdadera U_{ef}^v , la siguiente otra, consignada ya anteriormente aunque refiriéndola ahora a la movilidad electroforética real, U_{ef}^r :

$$\frac{u_{ef}^r \times d_r}{E} = \\ = \frac{C}{6 \times \pi \times \tau \times \eta} \times \frac{1}{1 + K \times r \times \sqrt{\mu_t}}$$

pues, despejando de ella el valor de u_{ef}^r después de sustituir el de E

por sus iguales $i \times R$ o $\frac{i}{\Lambda}$ se ob-

tiene la triple igualdad que se consigna a continuación, con la que, por deducirse de ella cómo influyen en el cálculo del valor de la velocidad electroforética real u_{ef}^r los diversos factores que la integran, factores que experimentalmente se determinan, es posible exponer algunas normas de imprescindible aplicación si se quieren efectuar electroforesis correctas, lo mismo cualitativas que cuantitativas, nor-

mas que seguidamente se van a concretar:

$$\begin{aligned} u_{ef}^r &= \frac{e_r}{t} = \\ &= \frac{E \times C}{d_r \times 6 \times \pi \times r \times \eta} \times \frac{1}{1 + K \times r \times \sqrt{\mu_r}} = \\ &= \frac{i \times R \times C}{d_r \times 6 \times \pi \times r \times \eta} \times \frac{1}{1 + K \times r \times \sqrt{\mu_r}} = \\ &= \frac{i \times C}{d_r \times 6 \times \pi \times r \times \eta \times \Lambda} \times \frac{1}{1 + K \times r \times \sqrt{\mu_r}} \end{aligned}$$

Primera. — Cuanto mayor sea la tensión aplicada E , mayor será el espacio recorrido a medir e_m y, por lo tanto, mayor el espacio real e_r , con lo que más exacto será el valor de la velocidad electroforética real w_{ef} . Ello es consecuencia natural de la aplicación de la conocida igualdad del impulso mecánico $f \times t$ con la cantidad de movimiento $m \times u$, pues, por ser la masa micelar mucho mayor que la iónica, la fuerza a aplicar para conseguir velocidad semejante a éstas tiene que ser mucho mayor, y se ha indicado antes que la fuerza que actúa en la migración micelar es proporcional a E .

Generalmente deben emplearse tensiones de 125, 220, 300 y hasta 600 volts., según la naturaleza de las micelas del problema.

Segunda. — Cada clase de micelas tiene su carga C , y su radio r (que interviene al cuadrado r^2) puede considerarse proporcional a su masa, m . El radio no está en nuestra mano variarlo sin alterar profundamente el grado de dispersión del problema; en cambio, la

carga micelar sí se puede variar mediante el pH de la mezcla reguladora soporte empleada, cosa que tampoco siempre puede hacerse, pues depende de la naturaleza del problema, y más aún de los fines para los que se electroforiza.

Es factor importante en los problemas constituidos por mezclas de micelas de constitución y magnitud moleculares análogas, y grados de dispersión semejantes, pues ello representa la muy probable semejanza de valores de r y C . Pero en el caso de que no pueda variarse ni r ni C en la forma indicada, caso el más general, queda el recurso de aumentar el tiempo t de duración de la experiencia, pues con él variarán proporcionalmente las distancias recorridas a medir e_m , aumentando con ello la diferencia entre los valores experimentalmente hallados, consiguiéndose así la identificación y determinación de cuerpos micelares químicamente muy afines e isodispersos, cosa del máximo interés en química biológica normal y patológica, si me permiten la palabra para expresar las alteraciones de la primera en los estados patológicos.

Tercera. — El tiempo que debe durar una operación electroforética no puede sujetarse a regla alguna, como se desprende de lo dicho en la norma anterior; generalmente es de unas horas.

Cuarta. — La distancia real entre los electrodos, d_r , debería ser

pequeña, según se deduce de las fórmulas anteriores, pero su disminución lleva aparejada la de la resistencia R del electrólito regulador de pH o, lo que es lo mismo, aumento de la conductibilidad Λ , disminución y aumento que ocasionan obtener valores más pequeños de la velocidad electroforética w_{ef} por una parte; por otro lado, todo ello produce un aumento de la intensidad, i , que, según otra norma que luego se verá, conviene sea lo más pequeña posible, y, finalmente, no conviene disminuir d_m , de la que d_r depende, por cuanto entonces puede no quedar distancia suficiente para medir espacio recorrido e_m , al objeto de la diferenciación micelar indicada en la norma anterior.

Por lo general, la distancia medible d_m , que, como se ha dicho anteriormente, es menor que la distancia real, d_r , de las fórmulas, acostumbra a ser de unos 30 cm.

Quinta. — La viscosidad η del electrólito regulador de pH en cuyo seno se verifica la migración micelar debe tener el valor más bajo posible, lo cual se consigue empleando mezclas reguladoras de pequeña concentración salina.

Sexta. — La fuerza iónica total μ_t de la mezcla reguladora de pH es uno de los factores más importantes a considerar, por cuanto con su disminución aumenta la resistencia R y disminuye la conductibilidad, Λ , y la viscosidad, η , aumento y disminuciones tan ne-

cesarios para hallar un valor aceptable de velocidad electroforética medible w_{ef}^m y real w_{ef}^r , según se acaba de ver en las normas anteriores.

Son varios los trabajos publicados que, por no tener en cuenta el valor de μ_t o, mejor dicho, no mencionarla, son irreproducibles, ocasionando las diferencias de valores hallados la necesidad de notas aclaratorias, propuestas diversas de variaciones de las demás condiciones e incluso de modificaciones de aparatos, cuando no discusiones casi siempre inútiles, por no decir desagradables.

Por lo general, el valor de la fuerza o concentración iónica total μ_t es de 0,1, y si, por las causas que sean, es desconocido, es indispensable indicar en forma muy detallada la composición de la mezcla reguladora (mejor dar la fórmula para prepararla).

Séptima. — La intensidad de la corriente debe ser de unos pocos miliamperios, mA, es decir, muy pequeña, ya que no interesa la descarga de las micelas ni rápida ni lentamente.

Pero la intensidad de corriente, i , debe ser pequeña, muy pequeña, por otra razón más importante, cual es la de conseguir un efecto Joule ($0,24 \times R \times I^2$) el más mínimo posible para evitar las dos acciones perturbadoras siguientes, consecuencia de la elevación de temperatura por la acción de la corriente eléctrica, elevación que va

aumentando hasta un cierto equilibrio durante el tiempo que dura la electroforesis, que, por lo general, es de horas; la primera acción perturbadora es aumentar la evaporación del disolvente de la mezcla reguladora de pH , en cuyo seno se verifica la electroforesis, pues, además de obligar a hacer una corrección mayor de la velocidad electroforética medida w_{ef}^m por el aumento del valor de la velocidad de evaporación w_{ev} según anteriormente se ha indicado, con dicha evaporación disminuye la resistencia del electrólito, R , aumenta su concentración y con ello su viscosidad, η , su fuerza iónica total, μ_t , y su conductibilidad, Λ , todo lo contrario precisamente que exigen las normas anteriores, aparte la variación del valor de su pH , que, como se insinuó, actúa sobre la carga C , aumentándola o disminuyéndola según el signo de ésta y la variación de aquél; la otra acción perturbadora importante también es la posibilidad de la parcial desnaturalización irreversible más o menos intensa de las micelas contenidas en el problema, inutilizando con ello por completo la determinación electroforética.

Octava. — La temperatura, por lo que se acaba de indicar en la norma anterior, debe permanecer lo más constante posible durante toda la determinación, que por lo general se efectúa a la temperatura ambiente. No obstante, puede practicarse bajo enfriamiento

en aparatos de refrigeración forzada, sobre todo cuando con ciertos problemas es necesario emplear grandes tensiones (de hasta 2.000 V.), con el subsiguiente aumento de la intensidad de corriente y, por lo tanto, de efecto Joule; y hay que tener en cuenta que, por cada watio, se produce una evaporación de 80 mm³ de $OH_2 \times cm^2$ en 1 hora a la temperatura ambiente de 20° C. y presión que oscile poco de 760 mm.

Novena. — Aunque directamente el pH no interviene en la triple igualdad que ha servido de base para deducir las normas anteriores, debe hacerse resaltar el interés e importancia que en toda electroforesis tiene.

Se insinuó en la norma segunda que el pH influye sobre la carga micelar, cosa evidente si se considera que las micelas pueden cambiar su carácter de basoides o de acidoides en presencia de mezclas reguladoras de pH mayor o menor de 7, principalmente las micelas dispersadas en los líquidos del organismo animal o vegetal, ya que en su mayoría son de tipo anfolitoide, e interesa en casi todos los problemas separarlas electroforéticamente en el mismo estado en que se encuentran en el organismo vivo de que proceden, salvo determinados casos en los que puede convenir cambiar el valor de su carga en cuantía mayor o menor e incluso su signo, cosa

fácilmente conseguible con la variación de pH.

En la inmensa mayoría de casos es recomendable emplear como mezcla reguladora una que posea el mismo pH que tiene el problema en el organismo o el que posee en el momento de electroforizarle; con ello se evita la posibilidad de que la mezcla reguladora empleada pueda poseer un pH tal que coincida con el punto isoiónico o con el punto isoelectrico de alguno o algunos de los componentes que integran el problema, con los resultados erróneos que entonces se obtendrían, lo mismo al investigarlos que al determinarlos, como consecuencia de las perturbaciones que en su estado de dispersión tendrían lugar.

Aparte de las normas indicadas, es necesario recordar algo sobre el papel electroforético empleado, ya que, además de conocer el valor de su factor de transformación, f_t , como se indicó anteriormente, debe reunir las mismas cualidades del papel cromatográfico salvo una, cual es la conveniencia de poseer pequeño poder adsorbente, pues, como éste se suma a la resistencia que el líquido ofrece a la migración micelar, si el poder de adsorción es elevado, pueden las micelas quedar adsorbidas antes de haber recorrido el espacio medible e_m que el valor de su movilidad electroforética U_{ef} exige en las condiciones con que se opere, con el error que ello representa. Teóricamente, en un problema

complejo, como consecuencia de la distinta constitución química de los diferentes cuerpos micelarmen- te dispersos que contiene, las micelas de cada naturaleza deben ser adsorbidas cuando la caída de tensión positiva o negativa, que representa el espacio recorrido medible e_m , diferente para cada uno de aquéllos, que exige su respectiva movilidad electroforética U_{ef} , haya adquirido el correspondiente valor para que la pérdida de fuerza de migración de cada clase de partículas dispersadas, fuerza que, como se ha dicho al principio del tema, le es proporcional, permita pueda actuar sobre ellos el poder adsorbente del papel electroforético empleado.

En este principio está fundado el procedimiento de la electroforesis continua, o mejor fraccionada, sobre papel, con la que se ha podido conseguir, regulando adecuadamente la velocidad de caída de la disolución reguladora de pH, y empleando papel de muy pequeño poder adsorbente, que la adsorción sea prácticamente nula y la electroforesis fraccionada se verifique según el principio teórico expuesto de la caída de tensión, siendo fácil conseguir hasta veinticuatro fracciones del problema en cantidades suficientes de cada uno de sus componentes para su análisis por micrométodos diversos.

Siguiendo las normas indicadas, los electroforogramas obtenidos permiten hacer cuantitativas a base de la determinación de den-

sidades ópticas, mediante los llamados densitómetros, consiguiéndose con sus datos obtener gráficamente con facilidad y gran claridad las curvas de Gauss correspondientes a cada componente contenido en un problema complejo, con la mayor exactitud que con ello se consigue al calcular por planimetría la superficie delimitada por cada curva mediante la conocida fórmula

$$S = K \times O_v \times a$$

en la que S es la superficie buscada, K una constante igual a 1,064, O_v la ordenada en densidad óptica del vértice de la curva y a la abscisa en centímetros correspondiente a la mitad del valor de O_v .

El tanto por ciento de cada uno de los componentes del problema es igual al porcentaje del respectivo valor de S hallado, en el valor resultante de la suma de todos los S calculados.

Las determinaciones que pueden efectuarse actualmente por macro o microelectroforesis son numerosísimas: su enumeración tan sólo necesitaría más tiempo del transcurrido, durante el que con tanta gentileza me han honrado escuchándome, por lo que, como final, sólo citaré las que creo más interesantes.

Aparte la investigación y determinación de iones minerales —la verdadera ionoforesis— que, utilizándola en su forma ionoforesis fraccionada o continua, permite la

separación de cada uno de los componentes de una mezcla de iones minerales de características químico-analíticas semejantes, se determinan ácidos grasos, polialcoholes y polifenoles, flavonoles, aminas, aminoácidos en sus dos formas anfolíticas con sólo variar el pH de la disolución soporte, lo que constituye una doble constante para su identificación; materias colorantes de diversos tipos naturales y sintéticas y sus mezclas; monosacáridos, disacáridos y polisacáridos y mezclas, previa producción de complejos, de ácido bórico generalmente, para comunicarles la carga eléctrica de que carecen, sin la cual no hay electroforesis posible, para los que se usa como medio de identificación un valor semejante al R_f de la cromatografía que representa la relación entre espacios reales recorridos e_r del complejo del H de C. problema y el recorrido por el correspondiente a la glucosa; el punto isoeléctrico y el isoiónico de cualquier cuerpo anfólito, anfólitoide o anfótero; ácidos nucleínicos y los productos de su hidrólisis, etc.

Desde un punto de vista médico, cabe citar el estudio de las hipo e hiperproteinemias, o, en general, disproteinemias con determinación de las cantidades de albúmina, fibrinógeno, globulinas α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ_1 , γ_2 . Las proteínas del líquido cefalorraquídeo, del jugo gástrico, de la orina para relacionar la proteinuria con la permeabilidad renal y las del humor acuoso del

ojo; hemoglobinas, enzimas y hormonas, proteínas celulares, lipoproteídos y reparto entre las diferentes proteínas séricas de los isótopos radiactivos, mediante aparatos contadores especiales para los electroforogramas con ellos obtenidos.

Y desde el punto de vista far-

macéutico, se determinan diferentes proteínas en leche, vitaminas, sulfamidas y sus mezclas, antibióticos, heterósidos y alcaloides y sus mezclas, aparte de un número elevado de diferentes medicamentos pertenecientes a todos los grupos en que pueden dividirse según su acción terapéutica.